

# Tetrazolium Chloride as an Indicator of Pine Pollen Germinability<sup>1)</sup>

By STANTON A. COOK and ROBERT G. STANLEY

(Received for publication May 11, 1960)

Controlled pollination in forest tree breeding requires pollen of known germination capacity. Methods of determining pollen viability include germination in a hanging drop, in a moist atmosphere, on agar gel, or in a sugar solution (DUFFIELD, 1954; DILLON *et al.*, 1957). Errors commonly arise in the application of these techniques because maximum pollen germination and growth is generally attained only when the grains are aggregated (HOLUBINSKI, 1945), or at optimal concentration of the pollen (BEAMS *et al.*, 1947). Furthermore, fungal infection commonly occurs when pollen is germinated *in vitro* longer than 24 hours. Thus, determination of pollen viability by germination is time-consuming and frequently unreliable.

In seed studies a rapid and simple test of germination capacity has been developed using 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). This colorless dye solution is reduced by dehydrogenase enzymes to an insoluble red formazan complex in living cells (SMITH, 1951). Capacity to germinate is assumed to be correlated with the activity of these enzymes. However, contradictory results have been obtained when TTC is used as an assay of pollen viability. It was found to be unreliable in testing cultivated varieties of peach, pear, apple, and grape (OBERLE *et al.*, 1953) but to be satisfactory in testing maize pollen (VIEITEZ, 1952). The dye methylene blue was used successfully on tests of germinability of coniferous and angiospermous pollen (MAURIN and KAUFOW, 1936). The purpose of the present study was to compare pine pollen viability as determined with TTC, with that obtained by germination on agar; also, to evaluate the potential use and value of TTC in tree breeding programs.

## Materials and Methods

Crystalline 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, from Nutritional Biochemical Corporation, was prepared as a 0.5 percent solution with deionized water. Tetracycline hydrochloride and nystatin, sold as Mysteclin by E. R. Squibb and Sons, was made up in a sterile 4 percent solution. Both solutions were stored at 5° C. until used. A 1.5 percent solution of Difco Bacto-agar was prepared with deionized water and sterilized by autoclaving.

Pollen samples were selected from collections of the Institute of Forest Genetics, U. S. Forest Service, Placerville, California. These samples had been collected in 1957 and stored under standard procedures (DUFFIELD, 1954) for 3 months.

The following procedure, modified from that developed in studies on maize pollen (VIEITEZ, 1952), was used to stain the pollen with TTC:

(1) Two lakes of two or three drops of 0.5 percent TTC solution were placed on a microscope slide.

(2) Sufficient pollen was sprinkled on these lakes to just cover the surfaces, (i. e., about one milligram of pollen per lake).

<sup>1)</sup> This study was performed at the Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service, U. S. Department of Agriculture, Berkeley, California, under a cooperative agreement with the Department of Botany, University of California.

(3) A cover glass was placed over each lake, care being taken to exclude most air bubbles.

(4) The slide was then placed in a petri dish on glass rods over water.

(5) The petri dish was covered and placed in the dark in an oven at 55° C.

(6) After 90 minutes the slide was removed and wiped free of moisture.

Slides were examined with binocular microscope at X 100 magnification, using blue filtered reflected light to provide contrast. The two lakes were replicates of each sample. The mechanical stage was moved randomly, and the pollen grains in a predetermined sector of the field were counted to a total of 25. The stage was again moved at random and 25 more grains counted. Two hundred grains were counted in each lake, giving a total of 400 from each sample.

The pollen which was considered to be stained ranged in intensity from 5.0 R (ed)  $y^{1/2}$  to 10.0 R (ed)  $8^{1/4}$  according to the MUNSSELL *Book of Color* (1946).

## Testing by Germination

The following procedure was employed to germinate pollen:

(1) (About 2 cc.) of agar solution was poured into a 5 cm. petri dish to uniformly cover the bottom.

(2) Three or four drops of Mysteclin solution were placed on the agar surface and evenly spread by rotating the dish.

(3) Approximately 3 mg. of pollen were distributed over the surface of the agar, care being taken to prevent the movement of the grains to the margins of the dish.

(4) The petri dish was then placed in an incubator at 29° C.

(5) Three additional drops of Mysteclin solution were added after 24 and 48 hours.

(6) After a minimum of 72 hours the petri dish was removed from the incubator, and the pollen samples were removed and examined.

Two loops of pollen from different places on the agar were removed and each was placed in a separate lake on the same slide. Thus, replicate samples were obtained which were similar to those used in the staining procedure. The same microscope and counting procedure was used as with TTC, except that white light was used instead of reflected light. When the pollen tube exceeded the maximum width of the grain it was considered to be germinated. No attempt was made to measure tube length.

## Results

Inherent limitations of these procedures must first be recognized and evaluated if the results are to be meaningful. Probably the most difficult problems in the TTC assay are avoiding manipulative procedures which decrease coloration and deciding when pollen grains are actually stained.

The intensity of pollen staining was observed to decrease toward the margin of the cover slip and in regions of air

bubbles. Table 1 summarizes observations indicating that decreasing available air increases coloration of the pollen. These results are in agreement with those of OBERLE and WATSON (1953) who showed that pollen would not stain unless a cover slip was used, or the cover slip was ringed with vaseline. GONSE and YOTSUYANAGI (1955), FRIED and ZWEIBACH (1955) have shown that simple agitation of pollen in the dye solution also suppressed coloration. These results all indicate that a possible reason for pollen failing to stain a uniform red may be the inhibition of reduction of the TTC by air. To minimize this source of error in testing pollen viability with TTC, only grains in masses remote from faded, high oxygen areas, should be counted.

Table 1. — Effect of exposure to air on staining of *Pinus ponderosa* pollen with 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride

No.	Treatment	Observation
1.	On slide under cover slip in air	Center of mass red, edges colorless to pink
2.	In open watch glass in air	Slightly red
3.	In tube with air bubbled through	Colorless

In some cases the color was uniformly distributed over the grain, exclusive of the wings, in others it was concentrated in globules. One possible explanation for this phenomenon may be that the TTC is absorbed by the lipoidal components of the cell. BROWN (1954) reported that TTC is strongly absorbed by lipids; also, ungerminated pine pollen is reported to contain up to 14 percent fat (ELSER and GANZMÜLLER, 1931). In the present tests this aggregation of color appears to increase with time of exposure to heat. Maximum staining was reached after approximately 90 minutes at 55° C. (Table 2). Very little staining occurred in the first 50 minutes. The greatest increase in staining occurred after 60—75 minutes.

Table 2. — Effect of time on staining of *Pinus ponderosa* pollen with 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride at 55° C.

Pollen	Time (hours)	Percent $\bar{x}$	S. D.
A	1.5	79.6	± 2.3
A	2.0	75.1	± 3.9
A	3.7	77.6	± 5.3
B	1.5	75.5	± 5.5
B	2.0	77.8	± 5.9

In the germination tests fungal contamination was almost always present in varying degrees. Past experience using ultraviolet light as a fungicide indicated that any fungicidal pretreatment of the pollen would probably affect the viability of the pollen more than the fungus. Hence Mysteclin, a combination fungistat-bacteriostat, was used in very low concentrations. Fungi and bacteria were checked although not completely inhibited. High concentrations were avoided because of the possible affect on pollen germination.

TTC viability assays of pine pollen are compared with germination in Table 3. Since each sample represents pollen from a different tree, the procedure usually followed in collecting pollen, it is not justifiable to combine the data for all *Pinus ponderosa* pollen, i. e., samples 1 to 6. In evaluating this data the lack of replicates within each sample must be recognized. Germination differences from

tree to tree may frequently be greater than interspecific differences. Since a large number of grains were counted in each sample, the defect resulting from lack of replicate samples was partially overcome.

Table 3. — Comparison of the number of pollen grains stained by TTC with the number germinating on agar for sixteen samples involving seven pine species

Sample number	Species	No. stained out of 400	No. germinated out of 400	$\chi^2$ <sup>1)</sup>
1	<i>Pinus ponderosa</i>	305	318	1.23*
2		288	281	0.30*
3		79	134	19.36
4		321	321	0.00*
5		287	254	6.22
6		276	311	7.84
		$\sum_1^6$ 1,556	1,619	
7	<i>Pinus sabiniana</i>	176	311	96.65
8		256	342	48.98
9		302	259	11.03
10		263	350	52.82
11		330	339	0.74*
		$\sum_7^{11}$ 1,327	1,601	
12	<i>Pinus resinosa</i>	375	382	1.20*
13	<i>Pinus rigida</i>	173	229	15.68
14	<i>Pinus nigra</i>	187	170	1.46*
15	<i>Pinus luchuensis</i>	341	140	210.64
16	<i>Pinus longifolia</i>	311	307	0.11*
		$\sum_1^{16}$ 4,270	4,448	

<sup>1)</sup>  $\chi^2$  computed according to (SNEDECOR, 1955, p. 198). —

\* Significant at the 5 percent level.

Data in Table 3 indicate that in 7 of the 16 samples (*P. ponderosa* No. 1, No. 2, and No. 4; *P. sabiniana* No. 11; *P. resinosa*, *P. nigra*, and *P. longifolia*), the number stained did not differ significantly from the number germinated. In six of the nine others where they differed significantly, the staining test underestimated germinability. Where the number colored exceeded the number germinated, the chi-square test generally showed no significant differences at the 5 percent level. However, where there were significant differences, the chi-square values were relatively low, i. e., 6.22 for *P. ponderosa* No. 5, and 11.03 for *P. sabiniana* No. 9. The anomaly which *P. luchuensis* presents may be the result of our inexperience in germinating pollen of this exotic species.

The totals provide a crude measure of the results. No attempt was made to compare these summations statistically, since as explained above, each sample represents pollen from a different tree collected under different conditions. However, of 6,400 pollen grains grown on agar, 4,448 germinated; of 6,400 grains stained with TTC, 4,270 displayed a red coloration. The 4 percent difference in these methods indicates that fair agreement can result when large samples are utilized.

### Discussion

To evaluate the significance and potential use of this rapid technique, an understanding of the object and technique of pollen germination *in vitro* in relation to tree breeding is required.

In laboratory studies a variation of ± 10 percent between replicate 200-grain pine pollen samples is not uncommon. However, usually only 50 or 100 grains are counted in field laboratories. The object of such deter-

minations is merely to be certain a fairly viable pollen is being used, i. e., above 40—50 percent viability, or to select the most viable from two or more available pollen lots. For these general purposes, the simple TTC test is probably entirely adequate if the pollen is fresh and the indicated percent viability is above 50 percent. Where these conditions are not met, then it is probably best to germinate all samples, or at least germinate representative samples.

In the present studies, germination percent was generally greater than the percent obtained by staining. Estimation of germinative capacity by growing pollen is more direct and valid, provided the number tested is representative of the actual sample from which it is taken and optimal germinating conditions are used. By the indirect TTC method, as shown above, if the pollen is of low germinative capacity, there is no way of knowing if the statistic obtained is equal to, more than, or less than the potential maximum. Lack of optimal germination conditions may possibly explain those TTC results which exceeded the germination data. It is conceivable that pollen of *Pinus luchuensis*, for example, may require a nutrient supplement or some special conditions for growth. In this and similar cases, the TTC test could be used to check and improve germination procedures until the best possible results are achieved. Likewise, the lower viability values obtained by TTC could be due simply to faulty use of the reagent. Perhaps different and better testing procedures can be found than those employed here; or another dye such as methylene blue or oxytetrazolium may give more valid results than TTC. An initial report by WORSLEY (1959) indicated that methyl green may be superior to TTC for determining gymnosperm pollen viability. But, another shortcoming of all staining tests is that inferences regarding pollen tube length can not be made.

In pine breeding we usually pollinate by brushing or blowing large quantities of pollen on receptive cones, hoping that the egg cell in the archegonium will be fertilized by a sperm nucleus from one grain. We are unable to measure the ability of pollen to provide sperm which can assure successful fertilization. Thus, an assay as crude as the TTC color reaction of fresh pollen may in most instances provide as valid an index of successful capacity to set seed as the more laborious germination procedures presently used.

#### Literature cited

- BEAMS, H. W., and KING, R. L.: Pollen germination in relation to group size. *Proc. Iowa Acad. Sci.* 54: 127—130 (1947). — BROWN, W. V.: A preliminary study of the staining of plant cells by tetrazolium chloride. *Bul. Torrey Bot. Cl.* 81: 127—136 (1954). — DILLON, E. S., and ZOBEL, B. J.: A simple test for viability of pine pollen. *Jour. Forestry* 55: 31—32 (1957). — DUFFIELD, J. W.: Studies on extraction, storage, and testing of pine pollen. *Z. Forstgenetik* 3: 39—45 (1954). — ELSER, E., and GANZMÜLLER, J.: Die chemische Zusammensetzung einiger Blütenstaubarten. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 194: 21—32 (1931). — FRIED, G. H., and ZWEIBACH, B. T.: Neotetrazolium studies of blood vessels. *Anat. Rec.* 121: 97—107 (1955). — GONSE, P. H., and YOTSUYANAGI, Y.: Note sur la reduction intracellulaire du triphenyl-tetrazolium dans les oeufs d'oursin. *Exptl. Cell. Res.* 8: 500—505 (1955). — HOLUBINSKI, I. N.: Studies on the physiology of the germination of pollen grains. *Compt. Rend. Acad. Sci. U.S.S.R.* 48: 62—63 (1945). — MAURIN, A. M., and KAUROV, I. A.: Comparative methods of determining pollen viability of tree species. *Bot. Zhur. S.S.S.R.* 41: 81—84 (1956). — MUNSELL, A. H.: A color notation. 10th ed. 74 pp. Munsell Color Company, Baltimore, Md. (1946). — OBERLE, G. D., and WATSON, R.: The use of 2-3-5-triphenyltetrazolium chloride in viability tests of fruit pollens. *Proc. Amer. Soc. for Hort. Sci.* 61: 299—303 (1953). — SMITH, F. E.: Tetrazolium salt. *Sci.* 113: 751—754 (1951). — SNEDECOR, G. W.: Statistical methods. 4th ed. The Iowa State College Press, Ames, Iowa (1955). — VIEITEZ, E.: El uso del cloruro 2, 3, 5 trifeniltetrazolium para determinar la vitalidad del polen. *Ann. Edafol. Fisiol. Veg.* 11: 297—308 (1952). — WORSLEY, R. G. F.: The processing of pollen. *Silvae Genetica* 8: 143—148 (1959).

## Berichte

### 7. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung 1960

Die 7. Tagung und die Mitgliederversammlung der Arbeitsgemeinschaft fand vom 26. bis 28. Juli 1960 in München unter der Leitung des bisherigen 1. Vorsitzenden Univ.-Prof. Dr. E. ROHMEDEK statt. Am 29. und 30. Juli schloß sich eine Exkursion in die Schweiz an.

Zum neuen 1. Vorsitzenden wurde gewählt Oberregierungsrat Dr. SCHLENKER, Stuttgart-Weil im Dorf, zum 2. Vorsitzenden Prof. Dr. SCHÖNBACH, Tharandt, zum Geschäftsführer und Kassenwart Dr. SEBALD, Stuttgart-Weil im Dorf. Eine längere Aussprache ergab sich über Organisationsfragen der praktischen Forstpflanzenzüchtung. Zur Intensivierung der Zusammenarbeit innerhalb der Arbeitsgemeinschaft wurde beschlossen, zwei Arbeitskreise zu bilden, die in den nächsten Jahren die Teilprobleme „Blühstimulierung in den Samenplantagen“ und „Pappelzüchtung in der Sektion Leuce“ bearbeiten sollen.

Das Vortragsprogramm in München wurde durch Exkursionen in den Forstlichen Versuchsgarten Grafrath, an die Forstliche Versuchsanstalt in Birmensdorf bei Zürich und in die Südschweiz ergänzt.

Die nächste Tagung der Arbeitsgemeinschaft soll 1962 in Stuttgart-Weil im Dorf stattfinden. DIMPLMEIER

#### Kurzfassungen der Vorträge

I. EIFLER, Waldsiedersdorf: *Untersuchungen zur individuellen Bedingtheit des Kreuzungserfolges zwischen Betula pendula und Betula pubescens.*

Der Inhalt des Vortrages erscheint als Originalbeitrag im nächsten Heft dieser Zeitschrift.

E. ROHMEDEK, München: *Bastardierung in der Gattung Abies.*

Die heimische Weißtanne ist einerseits wegen hoher Massenleistung, Schattenfestigkeit und günstiger Humuszersetzung des Nadelabfalls waldbaulich besonders geschätzt, andererseits wegen Empfindlichkeit gegen Winter- und Spätfrost, Trockenheit und Tannentrieblaus sehr labil.

Durch Kombinationszüchtung soll daher versucht werden, Tannenhybriden herzustellen, die höhere Widerstandsfähigkeit gegen alle Gefährdungen, größere Anpassungsfähigkeit an Grenzstandorte und noch höhere Massenleistungen aufweisen.

Von 1950 bis 1960 wurden in 7 Blütenjahren im Exotenversuchsgelände Grafrath unter Verwendung von 10 mannbareren Tannenarten insgesamt 35 Kombinationen hergestellt, mehrere davon in verschiedenen Jahren.

Untersuchungen an den Tannenpollen lieferten neue Erkenntnisse über Gestalt und Größe der Pollenkörner. So können z. B. die Pollen von *Abies veitchii* wegen ihrer Kleinheit von allen anderen untersuchten Arten unterschieden werden.

Die Kreuzungstechnik (Blütenisolierung) wurde durch Verwendung sehr großer Stoffbeutel rationalisiert. Solche große Stoffbeutel lassen sich bei Tannenarten wegen der dort häufigen Zusammenballung der weiblichen Blüten in Gipfelnähe besonders gut verwenden.

Zahlreiche Kombinationen führten zu starkem Heterosiseffekt, z. B. die Kreuzungen *A. veitchii* × *A. alba*, con-

color  $\times$  nordmanniana, concolor  $\times$  grandis, concolor  $\times$  procera u. a.

Bei Verwendungen von *A. concolor* erhält man fast immer starke Heterosis, doch sind die erzeugten Bastarde keineswegs uniform, sondern spalten z. B. in der Nadelfarbe stark auf. Alle reingrün- und langnadeligen Bastarde sind in der Wuchsleistung am stärksten den artreinen Nachkommen überlegen.

Bei Verwendung von *A. concolor* als Kreuzungspartner können voraussichtlich an der Nadelfarbe der Sämlinge die Leistungsfähigsten bereits im Sämlingsalter erkannt werden (Frühtest auf Wüchsigkeit).

Auch bei natürlich entstandenen Bastarden erwiesen sich reingrün- und langnadelige Hybriden zwischen *A. concolor* und *nordmanniana* besonders wuchskräftig (Spitzenleistung im achtjährigen Alter: 312 cm Höhe).

Die zahlreichen Hybriden der verschiedenen Kombinationen wurden zur Klärung des Vererbungsmodus morphologischer, anatomischer und physiologischer Eigenschaften benutzt. Der Vererbungsmodus ein und desselben Merkmals (z. B. Beharzung der Knospen, Behaarung der Triebe) ist je nach den zur Kreuzung verwendeten Arten verschieden.

Manche Hybriden sind an geringere Standortverhältnisse anpassungsfähiger und weniger frostempfindlich als unsere heimische Tanne.

Die bisherigen Ergebnisse rechtfertigen durchaus die Hoffnung, in absehbarer Zeit dem Waldbau Tannenhybriden mit gegenüber der heimischen Art günstigeren Eigenschaften bereitstellen zu können.

Autorreferat

G. EISENHUT, München: *Untersuchungen über die Morphologie und Ökologie der Waldbaumpollen.*

Die gegenwärtigen Kenntnisse über die Pollenmorphologie verdanken wir vorwiegend den umfangreichen pollenanalytischen und honigmikroskopischen Untersuchungen. Diese Forschungsrichtungen betrachten die Mikrosporen im mikroskopischen Durchlicht.

Für die forstliche Züchtung ist aber nicht die Form des gequollenen Pollenkornes bedeutsam, sondern die Gestalt maßgebend, die die Mikrosporen im Zeitpunkt der Freigabe aus den Pollensäcken, während des Lufttransportes und bei der Ablagerung auf der Mikropyle bzw. Narbe besitzen.

Es wurden deshalb die Pollenkörner im mikroskopischen Auflicht untersucht. Dieses Verfahren hat gegenüber der Durchlichtmikroskopie folgende Vorteile:

1. Die Beobachtung ist am unbehandelten Pollenkorn möglich,
2. die Mikroaufnahmen ergeben plastische Bilder,
3. die Lage des Pollenkornes ist einwandfrei festzustellen,
4. die Mikrospore kann genau vermessen werden,
5. das Auflichtbild zeigt im Gegensatz zum Durchlichtbild mehr Gestaltseinzelheiten, wodurch die Artunterscheidung erleichtert wird.

Die Untersuchungen haben teilweise neue Angaben über die Gestalt und Größe der Pollenkörner heimischer und fremdländischer Waldbäume erbracht.

Im Schrifttum werden eine größere Anzahl von Pollenarten als porenfrei beschrieben; dazu zählen u. a. auch die Lärche und die Douglasie. Tatsächlich besitzen diese Baumarten auffallend große Keimporen.

Die an den Mikrosporen vorgenommenen Dimensionsmessungen strebten die Erreichung reproduzierbarer Werte an, es wurden deshalb bei jedem Pollentyp die gestaltsbestimmenden Abmaße festgelegt und 40 Pollenarten mit insgesamt 18 000 Einzelmessungen vermessen.

Im Gegensatz zu den durchlichtmikroskopischen Untersuchungen fällt auf, daß die Abmaße der luftfeuchten Pollenkörner nur verhältnismäßig gering variieren.

Die Meßergebnisse und die Mikroaufnahmen ermöglichen eine naturgetreue, stark vergrößerte Nachbildung der Pollenkörner, die bei 47 Pollenarten vorgenommen wurde. Diese Pollenmodelle eignen sich ausgezeichnet zur Volumbestimmung.

Die Pollenkorngewichte wurden für 15 Baumarten auf einer Analysenwaage ermittelt, die auf 1/1 000 000 g genau anzeigte. Pollenproben wurden nach der Wägung auszählbarer Mikroaufnahmen hergestellt.

Die an 41 Pollenarten vorgenommenen Sinkgeschwindigkeitsmessungen ergänzen die im Schrifttum bereits vorhandenen 16 Angaben über forstliche Baumarten auf 45 Werte.

Autorreferat

G. BARTELS, Hann. Münden: *Enzymteste an Waldbäumen.*

Befunde aus der biochemischen Genetik weisen darauf hin, daß zwischen Gen und Enzym oft sehr enge Beziehungen bestehen. Der Verfasser nimmt deshalb an, daß die Ergebnisse von Enzymuntersuchungen an Waldbäumen für deren Genetik von Interesse sein können. — Untersucht wurden (1) die Malat-Dehydrogenase, deren bekannte Funktion im Zitronensäurezyklus liegt, (2) die Diphosphofruktose-Aldolase aus dem anaeroben Teil des Kohlenhydratstoffwechsels und (3) die Glutamat-Aspartat-Transaminase, die im Eiweißstoffwechsel eine Rolle spielt. Der Verfasser bediente sich zur Messung der spektrophotometrischen Methode nach WARBURG und CHRISTIAN (Biochem. Z. **287**, 291, 1936). Die Pflanzenteile wurden in Phosphatpuffer pH 7,5 homogenisiert und dann hochtourig zentrifugiert. Der Überstand fand als Enzympräparat Verwendung. Eine derartige Extraktion ist jedoch nur dann möglich, wenn keine Inhaltsstoffe vorhanden sind, welche die Enzymproteine denaturieren, wie z. B. Gerbstoffe. Die Zahl der möglichen Untersuchungsobjekte ist aus diesem Grunde sehr klein. Die angegebenen Enzyme ließen sich in den Samen mehrerer Nadelbaumarten, in Nadel- und Laubbaumpollen sowie in Pappelblättern nachweisen. — Fichtensamen aus höheren Lagen des Harzes ergaben eine höhere Enzymaktivität als solche aus tieferen Lagen. Das weist darauf hin, daß die Enzymaktivität der Samen weitgehend durch die Reifebedingungen beeinflusst wird. — An Lärchenpollen einer Samenplantage waren die Aktivitätsverhältnisse der einzelnen Enzyme zueinander klon-spezifisch. — Die Blätter verschiedener Pappelklone wiesen unterschiedliche Enzymaktivitäten auf. Vor allen Dingen aber zeigte sich, daß das Verhältnis der Aktivitäten der einzelnen Enzyme zueinander im Tagesverlauf klon-spezifischen Änderungen unterworfen ist. Die weiteren Untersuchungen sollen klären, inwieweit diese Ergebnisse den tatsächlichen Verhältnissen in vivo entsprechen und in welchem Maße sie durch Hemmstoffe, die sich z. T. erst sekundär im Extrakt bilden, verursacht sind.

Autorreferat

K. HOLZER, Mariabrunn/Wien: *Ergebnisse einer Fichtensämlingstestung in der Kulturkammer.*

Aus der Fichtensamenernte 1958 haben wir Samen von insgesamt 103 Einzelbäumen einer näheren Untersuchung zugeführt. Besondere Beachtung hat dabei der Versuch einer Sämlingstestung in der Kulturkammer gefunden. Die Sämlinge wurden drei Monate lang bei täglich 16 Stunden Beleuchtungsdauer in der Kammer belassen und nachher verschiedenen Messungen und Bestimmungen unterzogen. So wurden gemessen: Länge von Trieb, Hypokotyl und Wurzel; Knospenbildungen, Wurzelverzweigungen; Kotyledonenzahlen; Gewichte wurden bestimmt von Samen, Trieb, Hypokotyl und Wurzel im frischen und wasserfreien Zustand. Zur Testung wurden je Einzelbaum die aus 100 Korn erwachsenen Sämlinge herangezogen, deren Anzahl somit zwischen 40 und 95 schwankt.

Unter den dabei festgestellten Merkmalen seien hier folgende gegenseitige Beziehungen angeführt: einen eindeutigen Einfluß übt die Seehöhe der Mutterbäume aus; praktisch bei allen bestimmten Merkmalen ist ein Zusam-

menhang damit festzustellen, besonders deutlich ist dieser bei den Merkmalen Triebabschluß während der Versuchszeit, Hypokotyl- und Trieblänge, ferner beim Wassergehalt der assimilierenden Teile. Die Verhältniszahlen der Wurzellänge und der Trieblänge zur Gesamtlänge geben eine besonders wertvolle Beziehung zur Herkunft des Saatgutes wieder.

Einen weiteren sehr beachtlichen Einfluß übt das Samengewicht aus: dieser betrifft vor allem die in diesen Monaten produzierten Trockengewichte, vor allem Hypokotyl-, meist auch Triebgewicht. Ein ziemlich deutlicher Einfluß ist auch auf die Kotyledonenzahl festzustellen, die aber, im Gegensatz zum Samengewicht, außerdem noch mit abnehmender Seehöhe leicht ansteigt. Desgleichen zeigt die Hypokotyllänge einen merkbaren Einfluß des Samengewichtes.

Ein weiterer Versuch, bei dem die Sämlinge von 22 Einzelbäumen unter vier verschiedenen Beluchtungszeiten vier Monate lang kultiviert wurden, zeigt besonders eindrucksvoll die Abhängigkeit des Triebabschlusses von der Tageslänge einerseits und von der Seehöhe des Mutterbaumes andererseits; besonders stark sind die dabei erzielten Unterschiede in der Trieblänge, die in erster Linie durch die bedeutend verlängerte Wuchszeit bei den Tieflagenherkünften noch verstärkt werden.

Soweit die bisherigen Auswertungen erkennen lassen, geben die Untersuchungen in der Kulturkammer verschiedene Anhaltspunkte, vor allem über die zugehörige Höhenstufe des Mutterbaumes; es genügt dabei jedoch nicht die Bestimmung eines einzigen Merkmales, erst die Kombination verschiedener Bestimmungen kann Verlässliches aussagen.

*Autorreferat*

H. J. FRÖHLICH, Hann. Münden: *Untersuchungen über Benadelungsverhältnisse verschiedener Fichten-Provenienzen.*

1. Die Stoffproduktion eines Baumes wird entscheidend von der Leistungsfähigkeit seiner Assimilationsmasse bestimmt, die von der Intensität des Gasaustausches je Bezugsgröße, dem Kronenvolumen und der Benadelungsdichte abhängig ist. An den Schweizer Fichten-Provenienzversuchen wies BURGER nach, daß mit zunehmender Seehöhe die Anzahl der benadelten Jahrestriebe steigt. Diese Erscheinung wird von ihm auf Umweltbedingungen zurückgeführt. ZEDERBAUER schließt aus den österreichischen Fichten-Versuchen auf eine rassische Differenzierung. Für Züchtungsfragen bei Fichte wird die Benadelungsdichte zu einer wichtigen Grundlage.

2. An einer 35jährigen Fichten-Provenienzfläche des Lehrforstamtes Gahrenberg, die neun Herkünfte von allen drei Teilarealen des Fichtenverbreitungsgebietes aus Seehöhen von 100 bis 1200 m aufweist, wurden im Winter 1956/57, im Herbst 1958 und im Sommer 1960 die Nadeljahrgänge von 40 Einzelstämmen je Provenienz gezählt. In der Regel tragen Schattenzweige eine höhere Anzahl Nadeljahrgänge als Lichtzweige. Eine strenge Beziehung zur Seehöhe des Herkunftsortes konnte mit keiner Aufnahme gefunden werden. Daher dürfte die Ansicht von BURGER, daß es sich um standörtliche Variationen handelt, berechtigt sein. Im Durchschnitt wurden vier bis sechs Nadeljahrgänge ermittelt.

3. Da eine Aufnahme kurz nach dem Trockensommer 1953, die letzte aber unmittelbar nach dem Trockenjahr 1959 erfolgte, konnten an der Nadelhaltung Rückschlüsse auf das Trockenertragnis einzelner Herkünfte gezogen werden. In beiden Beobachtungsreihen kam übereinstimmend zum Ausdruck, daß trockenislabile Fichten bei Anpassung der ökologischen Bedingungen durch Abwerfen ihrer Nadeljahrgänge reagieren, was zu Schädigungen in der Krone, teilweise sogar zum völligen Absterben des Baumes führen kann. Es bildeten sich drei Gruppen heraus:

a) die Tieflagenherkünfte aus Ostpreußen und Ostschlesien, die sich durch zahlreiche Nadeljahrgänge, geringe

Einschränkung nach Trockenperioden und durch gute Trockenisresistenz auszeichneten,

- b) die Fichten aus dem alpinen Teilareal, die in der Regel eine geringere Nadeljahrganghaltung, höhere Nadelverluste nach Trockenheit und nicht unerhebliche Trockenisschäden nach 1959 aufwiesen,
- c) die Mittelgruppe aus dem herzynischen Verbreitungsgebiet, die zwischen den beiden Extremen eine mehr oder weniger scharfe Mittelstellung einnahm.

4. Eine ähnliche Abstufung konnte in den drei parallel laufenden Aufnahmen über die Bildung der Trockenastzone und die damit verbundene Astreinigung gefunden werden. Die ostpreußischen und schlesischen Fichten aus den Tief- und Mittellagen zeigen eine wesentlich schnellere Trockenastbildung als Fichten aus Süddeutschland und aus den Hochlagen. Insbesondere haben Hochlagenfichten das Bestreben, auch unter anderen Standortverhältnissen, wie auf der Versuchsfläche des Reinhardswaldes in 400 m Seehöhe, ihren Kronenmantel bis zur Erde grün zu halten. Trockenperioden wirken sich beschleunigend auf die Trockenastbildung aus.

5. In der Gegenüberstellung von Nadelgewicht und -anzahl je 10 cm Sproß konnten zwischen den einzelnen Provenienzen meist keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Hingegen waren die Schwankungen von Stamm zu Stamm so beträchtlich — teilweise bis zu 100% —, daß hierin eine Individualeigenschaft gesehen werden muß. Vergleichsuntersuchungen in zwei unterschiedlichen Wachstumsgebieten des Harzes, auf 200 m NN im Forstamt Westerhof und auf 500 bis 600 m NN im Forstamt Braunlage haben in gleicher Weise bei dicht nebeneinanderstehenden Bäumen auffällige Unterschiede ergeben, so daß die individualspezifische Eigenschaft bestätigt wird.

*Autorreferat*

G. SCHELL, München: *Keimschnelligkeit als Erbeigenschaft.*

Während die Frage der Keimschnelligkeit bisher hauptsächlich im Zusammenhang mit der Pflanzenausbeute, also mit dem Pflanzenprozent eine Rolle spielte, wurde sie erneut aktuell im Zusammenhang mit Fragen der forstlichen Genetik.

Die Frage nach dem Erfolg der Auslese von Saatgut wurde bislang meist an morphologischen Merkmalen, wie z. B. der Korngröße, untersucht.

Es lag deshalb nahe zu prüfen, ob eine keimungsphysiologische Eigenschaft wie die Keimschnelligkeit sich als Kriterium für die Auslese von Saatgut eignet und welche Folgerungen die forstliche Züchtung und Praxis aus sich allenfalls ergebenden Zusammenhängen ziehen soll.

Das Ausgangsmaterial für die Untersuchungen waren die Samen mehrerer Ernten von insgesamt 60 Mutterbäumen, die seit 1935 am Institut für Forstamenkunde und Pflanzenzüchtung der Forstlichen Forschungsanstalt München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. ROHMEDER zur Entwicklung eines Verfahrens der Nachkommenschaftsprüfung von ausgesuchten Einzelbäumen bearbeitet werden.

Es ergab sich, daß ein Zusammenhang zwischen der Keimschnelligkeit und späterer Wachstumsleistung nicht gegeben ist. Die Keimschnelligkeit kann daher nicht als Ausdruck der Wuchspotenz oder als Jugendtest für spätere Wachstumsleistung benutzt werden.

Dagegen läßt sich die Keimschnelligkeit bis zu einem gewissen Grad als Testmerkmal für Provenienz- und Sortenteste verwenden. Voraussetzung dafür ist jedoch, daß vergleichende exakte Anbauversuche gleicher Sorten oder Herkünfte auf verschiedenen Standorten oder verschiedener Herkünfte oder Sorten auf gleichem Standort durchgeführt werden, um perigene Einflüsse von der Wirkung der Erbanlage abgrenzen zu können.

Die festgestellte Eigenschaft von Einzelbäumen, besonders schnell oder auch besonders langsam zu keimen, kann an von Natur aus schon langsam keimenden Samenarten

von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung sein. Stark verzögert keimende oder überliegende Samen sind für die Pflanzenanzucht in Baumschulen oft völlig wertlos. Es wird deshalb oft wichtig sein, Individuen mit der genetischen Anlage zur Keimverzögerung für Züchtungszwecke gar nicht erst auszuwählen. In Sonderfällen, wie z. B. bei der stark keimgehemmten Zirbelkiefer, kann eine ausgesprochene Züchtung auf Keimschnelligkeit von größerer wirtschaftlicher Bedeutung sein.

Ein Zusammenhang zwischen dem Keimzeitpunkt und der Neigung zum Früh- und Spättreiben wurde nicht gefunden. Auch zwischen dem Tausendkorngewicht als Erbeigenschaft von Einzelbäumen und der Keimschnelligkeit als Erbeigenschaft besteht keine Korrelation.

Autorreferat

J. KRAHL-URBAN, Hemeln: *Einige Ergebnisse von Drehwuchs-Untersuchungen bei Rotbuchen.*

Die Untersuchungen wurden durchgeführt: Im Lehrforstamt Bramwald in mehreren Buchenbeständen verschiedenen Alters, in einer Versuchsfläche mit 10jährigen Ein-

zelbaum-Nachkommenschaften und an rund 1200 fm eingeschlagenem Buchen-Stammholz, ferner in Buchenbeständen verschiedener Herkunft Nordrhein-Westfalens. Die Ergebnisse lauten:

1. Die Anteile drehwüchsiger Buchen in den Beständen schwanken zwar in mehr oder weniger weiten Grenzen, jedoch sind Abhängigkeiten weder vom Bestandesalter, noch von der Bestandesverfassung, noch von den Bestandesverhältnissen, wohl aber von der Provenienz erkennbar.

2. Linksdrehung tritt wesentlich häufiger als Rechtsdrehung auf.

3. Überwiegend beschränkt sich der Drehwuchs nicht auf den Stamm, sondern er zeigt sich auch in Drehungen und Windungen an Kronenästen und -zweigen.

4. Alles deutet erneut darauf hin, daß Drehwuchs bei Buchen eine dominante Erbeigenschaft ist.

5. Die durch Drehwuchs bei Buchen verursachte Minderung des Holzwertes ist erheblich. Sie betrug im Bramwald 7%.

Autorreferat

## Buchbesprechungen

**Maschineneinsatz bei Ödland- und Kahlfächenaufforstung.** Ein Erfahrungsbericht aus Baden. Von E. BURCKHARDT. 72 Seiten mit 55 Abb. BLV Verlagsgesellschaft München, Bonn, Wien, 1960. Kart. 8,60 DM.

Der Bericht behandelt die Aufforstung von 1000 ha Kahlfäche und Ödland im mechanisierten Kulturverfahren in der badischen Rheinebene. Es werden alle mit dem Gesamtproblem zu lösenden Fragen, wie Räumung verlichteter Altbestände, Stockrodung, Holzartenwahl, Bestockungstypen, Verfahrensfragen, Pflanzenanzucht, Bodenarbeiten (Vollumbruch), Düngung, Saaten, Pflanzung, Pflege (auch künstliche Beregnung), Forstschutz usw. mit Kostenberichten und Ergebnissen besprochen. Ihre besondere Bedeutung gewinnt diese Arbeit durch die eingehende Darstellung des umfangreichen und weitgehenden Einsatzes der heute verfügbaren Geräte und Maschinen. Für die beschafften Maschinen werden Beschreibung, Herstellerfirmen, Preise und Leistungen gebracht. Zahlreiche Bilder erläutern Planung und Ausführung der Arbeiten, insbesondere den Maschineneinsatz (auch Pflanzmaschinen verschiedener Typen). — Der Arbeit kommt zu einer Zeit des größten Mangels an Arbeitskräften besondere Bedeutung zu.

SCHULZ

**Unkrautbekämpfung in der Forstwirtschaft.** Die wichtigsten Unkräuter und neue Wege zu ihrer Bekämpfung. Ein Leitfaden für die Praxis. Von P. BURSCHEL und E. RÖHRIG. 92 Seiten mit 72 Zeichnungen von R. KLIEFOTH. 1960. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin. Kart. 9,80 DM.

Für alle Institutionen, die sich hauptamtlich oder auch nur nebenbei zwecks Erzeugung wissenschaftlichen Untersuchungsmaterials mit der Erziehung von Forstpflanzen im Kampf bzw. auf der Freifläche zu befassen haben, bereitet die Unkrautbekämpfung meist erhebliche Sorgen. Neuerdings ergeben sich infolge Verknappung und Verteuerung von Arbeitskräften dabei in vielen Fällen nicht zu unterschätzende Schwierigkeiten. Es sei deshalb auch im Rahmen dieser Zeitschrift auf das Erscheinen eines Büchleins hingewiesen, mit dessen Hilfe es jedem Praktiker, der Forstpflanzen ordnungsgemäß anziehen muß, ermöglicht wird, die seine Arbeit beeinträchtigenden Unkräuter und ihre Lebensweise kennenzulernen. Darüber hinaus findet er die Beschreibung von Möglichkeiten für ihre mechanische und chemische Bekämpfung. Außerdem werden die Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten wesentlicher chemischer Unkrautbekämpfungsmittel erläutert und Verfahren für ihre praktische Anwendung beschrieben. Die Lektüre des angezeigten Büchleins kann als Anregung für praktische Überlegungen sehr empfohlen werden, zumal es Hinweise dafür enthält, wie möglicherweise bessere Ergebnisse mit geringeren Kosten erzielt werden können. SERRZ

**Fortschritte in der Forstwirtschaft.** Entwicklung und Stand forstlicher Erkenntnisse und Erfahrungen in den letzten 15 Jahren. Herausgeg. von Forstmeister Dr. F.

BAUER. XVI, 308 Seiten mit 7 Abb. BLV Verlagsgesellschaft München, Bonn, Wien, 1960. Ganzleinen 25,00 DM.

Der Herausgeber hat es sich zum Ziel gesetzt, in diesem Sammelwerk den Stand und die Entwicklung forstlicher Erkenntnisse und Erfahrungen der letzten 15 Jahre darzustellen. Das Buch enthält Abschnitte über

Forstbotanik (Prof. Dr. B. HUBER),

forstliche Samenkunde, Genetik und Züchtung (Prof. Dr. E. ROHMEDER),

forstliche Bodenkunde (Prof. Dr. W. WITTICH),

Bestandesverjüngung (Prof. Dr. A. BONNEMANN),

Waldpflege (Prof. Dr. J. N. KÖSTLER),

Forstschutz (Prof. Dr. G. WELLENSTEIN),

Wald und Wild (Prof. Dr. F. NÜSSELEIN),

forstliche Ertragskunde (Prof. Dr. R. SCHÖBER),

Grundlagen der Forsteinrichtung (Prof. Dr. M. PRODAN),

Walderschließung und Wegebau (Prof. Dr. F. BACKMUND),

Holzeinschlag und Holztransport (Prof. Dr. H. STEINLIN),

Holzveredlung und Holzverwertung (Prof. Dr. H. MAYER-WEDELIN),

Forstverwaltung (Prof. Dr. K. HASEL),

forstliche Betriebswirtschaftslehre (Prof. Dr. G. SPEIDEL),

Forstpolitik (Prof. Dr. J. SPEER),

das forstliche Versuchswesen im Wandel der Zeiten (Prof. Dr.

G. MITSCHERLICH) und

internationale forstwissenschaftliche Zusammenarbeit (Prof. Dr.

J. WECK).

Es ist klar, daß der größte Teil der Aufsätze mit speziell deutschen Fragen beschäftigt ist und dies auch sein muß, wenn das Buch dem Leserkreis genügen soll, für den es bestimmt ist: die Waldbesitzer und Forstleute in Deutschland. Für den Ausländer dürfte es vor allem Interesse haben, wenn er sich einen Überblick über die Verhältnisse in Deutschland verschaffen will. Für die den naturwissenschaftlichen Grundlagen gewidmeten Abschnitte gilt dies selbstverständlich nicht; hier wurde das ausländische Schrifttum mitverarbeitet.

Die beiden ersten Abschnitte dürften den Leserkreis dieser Zeitschrift am meisten interessieren. Deshalb wird die Besprechung auf sie beschränkt.

Prof. HUBER teilt das Gebiet der *Forstbotanik* in bewährter Weise in einen speziellen und einen allgemeinen Teil auf. Er will unter „Forstbotanik“ eine angewandte Wissenschaft verstanden wissen: „Sie betreibt Botanik, also Pflanzenkunde, soweit sie dem Forstmann theoretisch (Forstwissenschaft) und praktisch (Forstwirtschaft) helfen kann.“ Zur speziellen Forstbotanik zählt er die Dendrologie, Vegetationskunde und Waldgeschichte, zur allgemeinen die Baumanatomie und Baumphysiologie, die jeweils in besonderen Kapiteln behandelt werden. Abgesetzt von den beiden Hauptabschnitten wird die Forstpathologie behandelt, unterteilt nach Forst- und Holzschutz. Besonderes Gewicht legt der Verfasser auf die Darstellung der im Berichtszeitraum entwickelten Untersuchungsmethoden und die damit erhaltenen Ergebnisse. Der Leser erhält auf diese Weise nicht nur einen Überblick des Wissens-